



Universidade Federal da Paraíba
Centro de Tecnologia em Desenvolvimento Regional
Departamento de Tecnologia Sucroalcooleira



TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Avaliação do pré-tratamento ácido e hidrólise
enzimática da palha de cana-de-açúcar para produção de
etanol de segunda geração

Jordão Pedro de Lucena Ferreira

Orientador (a): Prof^ª. Dr^ª. Solange Maria de Vasconcelos

João Pessoa-PB

2018

Universidade Federal da Paraíba
Centro de Tecnologia em Desenvolvimento Regional
Departamento de Tecnologia Sucroalcooleira



TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**Avaliação do pré-tratamento ácido e hidrólise enzimática da
palha de cana-de-açúcar para produção de etanol de segunda geração**

JORDÃO PEDRO DE LUCENA FERREIRA

Trabalho de Conclusão do Curso de Tecnologia em Produção Sucroalcooleira do Centro de Tecnologia e Desenvolvimento Regional da Universidade Federal da Paraíba, como requisito para a obtenção do grau de Tecnólogo em Produção Sucroalcooleira.

Orientador (a): Prof^ª. Dr^ª. Solange Maria
de Vasconcelos

João Pessoa, PB

F383a Ferreira, Jordao Pedro de Lucena.

Avaliação do pré-tratamento ácido e hidrólise enzimática da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol de segunda geração / Jordao Pedro de Lucena Ferreira. - João Pessoa, 2018.

50 f.: il.

Orientação: Solange Maria de Vasconcelos, Vasconcelos.
Monografia (Graduação) - UFPB/CTDR.

1. Etanol 2G, pré-tratamento, hidrólise enzimática. I.
Vasconcelos, Solange Maria de Vasconcelos. II. Título.

UFPB/

TCC aprovado em 05/11/18 como requisito para a conclusão do curso de Tecnologia em Produção Sucroalcooleira da Universidade Federal da Paraíba.

BANCA EXAMINADORA:

Solange Maria de Vasconcelos

Profª. Drª. Solange Maria de Vasconcelos - (UFPB – Orientadora)

Joelma Moraes Ferreira

Profª. Drª. Joelma Moraes Ferreira - (UFPB – Membro interno)

Sarah Ingrid dos Santos Silva

Tecnóloga Sarah Ingrid dos Santos Silva - (Membro externo)

Dedico este trabalho aos meus pais Josinete e Josias e aos meus irmãos Joel e Joéloisa. E a todos aqueles que lutam incansavelmente por um mundo melhor. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela proteção, pela companhia e orientação, durante esse período da minha vida.

Agradeço a minha família, aos meus pais, Josias da Silva Ferreira e Josinete Pereira de Lucena Ferreira, ao meu irmão Joel e a minha irmã Joéloisa, a minhas primas, Jicaury e Emanuelle, por todo o amor, apoio, cuidado e dedicação em minha vida. Por serem a razão pela qual eu quero melhorar cada vez mais, Obrigado.

Agradeço a minha orientadora Prof^a. Dr^a. Solange Maria de Vasconcelos por ter aceitado me orientar nesse trabalho e ter me guiado com toda atenção e compreensão, sou extremamente grato pela dedicação e empenho na execução deste trabalho. Se minha gratidão fosse quantificável estatisticamente, como toda certeza, obteríamos 100% de significância. .

Agradeço aos meus amigos e amigas, Ivanildo Jacinto, Ederaldo Junior, Diego Thomas, André Luiz, Paulo, Isabela, Ozânia, Wycleff, Raquel, Elton, Thayná, e a diversos outros amigos que dividiram as dores e as alegrias comigo durante o curso, grato pelo companheirismo e apoio; vou levar essas amizades para o resto da vida.

Faço alguns agradecimentos póstumos; a minha Tia Jacinta que carrego com todo amor no coração, a Wendson que foi uma das pessoas mais inteligentes que conheci, e a José Carlos Júnior vulgo, Beija-flor, uma personalidade inigualável, carrego vocês em minhas memórias e vivos em meu coração.

Aos técnicos de laboratório Aline Gouveia, Larissa Farias, Hébert Henrique, Claudia Gouveia, Aline Souza e Gisleânia, pelo auxílio nas execuções das análises, apoio, compreensão. Um agradecimento especial a Diego Araújo Batista e a José Carlos, que além de técnicos exemplares tornaram-se amigos insubstituíveis.

Agradeço ao Departamento de Tecnologia em Produção Sucroalcooleira, meu amado departamento, onde aprendi a amar o curso e me dedicar para seguir na vida profissional.

Agradeço a todos os professores do departamento pela confiança e sabedoria passada durante todos esses anos.

Agradeço a todos que participaram direta e indiretamente desta conquista.

“O segredo do sucesso é a constância para o objetivo. ”

Benjamin Disraeli

RESUMO

A industrialização consumou a relevância do conhecimento sobre as fontes energéticas, atualmente o consumo de combustíveis fósseis representa 80% da demanda mundial. Visando essa problemática surgem os biocombustíveis. O Brasil é um dos maiores produtores de biomassa destacando-se a nível mundial. Essa biomassa obtém-se o Etanol de Segunda Geração (E2G). A conversão da biomassa envolve o pré-tratamento; a hidrólise; fermentação e a recuperação do etanol por destilação. O pré-tratamento é um dos gargalos na produção em larga escala. Para avaliação do pré-tratamento foi empregado um planejamento experimental 2^2 , mais três pontos, sendo as variáveis estudadas a concentração de H_3PO_4 (0,5 – 2,5%, m/v) e tempo (10 – 30 minutos), mais três pontos centrais, totalizando 7 experimentos. Todos os experimentos de pré-tratamento foram realizados em autoclave, a temperatura fixa de 121 °C, mantendo uma relação sólido: líquido de 1:10. Em seguida aos pré-tratamentos, foi realizada a hidrólise enzimática (em duplicata) das frações sólidas obtidas, nas seguintes condições: 50 °C, pH 4,8 (tampão citrato de sódio), sob agitação constante de 150 rpm em shaker agitador, utilizando-se uma enzima do Complexo Celulase (Novozymes) aplicando-se uma carga enzimática de 15 FPU/g_{palha}, durante 72 horas. A eficiência dos pré-tratamento foi avaliada através da liberação de açúcares redutores obtidos no pré-tratamento, solubilização dos componentes macromoleculares e concentração de açúcares redutores no hidrolisado enzimático. Os resultados foram analisados através do software Statistica 10.0, ao nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$). Os pré-tratamentos apresentaram uma concentração de açúcares redutores variando de 2,34 a 8,23 g/L. As maiores solubilizações macromolecular, sendo de 19,94 e 23,80%, respectivamente, para a condição mais severa de ácido (2,5% m/v). A concentração de ácido e o tempo empregados apresentaram significância estatística para a solubilização de componentes macromoleculares a 95% de confiança. Após a análise de variância (ANOVA) para o modelo codificado de primeira ordem, verificou-se que o mesmo foi significativo. Em relação à liberação de açúcares redutores após a etapa de hidrólise enzimática, a maior concentração alcançada foi de 5,20 g/L o tempo de pré-tratamento de 30 minutos e concentração de H_3PO_4 2,5% (m/v), que se refere à condição mais severa aplicada no presente estudo. No intervalo estudado, as variáveis não apresentaram significância estatística, mas houve um indicativo da influência da concentração de ácido sobre os açúcares liberados após a hidrólise enzimática. A lignina é principal empecilho para o tratamento com ácido diluído, mas a temperatura e o tempo de reação também interferem. Faz-se necessário que se reavaliem as condições de processo e se busquem outras hipóteses que podem corroborar a viabilidade da produção do Etanol 2G.

Palavras chave: lignocelulose; palha de cana-de-açúcar; pré-tratamento ácido diluído; hidrólise enzimática.

ABSTRACT

Industrialization has consumed the relevance of knowledge about energy sources, currently consumption of fossil fuels represents 80% of world demand. Aiming at this problem arise the biofuels. Brazil is one of the largest biomass producers in the world. This biomass yields the Second Generation Ethanol (E2G). Biomass conversion involves pretreatment; hydrolysis; fermentation and the recovery of ethanol by distillation. Pretreatment is one of the bottlenecks in large-scale production. To evaluate the pre-treatment, an experimental design was used 22 plus three points, with the variables being studied the concentration of H_3PO_4 (0,5-2,5%, m / v) and time (10-30 minutes) plus three points, totaling 7 experiments. All pretreatment experiments were performed in an autoclave at a fixed temperature of 121 ° C, maintaining a solid: liquid ratio of 1:10. After the pre-treatments, the enzymatic hydrolysis (in duplicate) of the solid fractions obtained, under the following conditions: 50 °C, pH 4,8 (sodium citrate buffer), under constant agitation of 150 rpm in shaker shaker, using An enzyme from the Cellulase Complex (Novozymes) was applied by applying an enzymatic charge of 15 FPU/g_{straw} for 72 hours. The pretreatment efficiency was evaluated by the release of reducing sugars obtained in the pretreatment, solubilization of the macromolecular components and concentration of reducing sugars in the enzymatic hydrolyzate. The results were analyzed through Statistica 10.0 software, at a significance level of 5% ($\alpha = 0.05$). The pre-treatments presented a concentration of reducing sugars varying from 2,34 to 8,23 g / L. The highest macromolecular solubilizations, being 19,94 and 23,80%, respectively, for the most severe acid condition (2,5% m/v). The acid concentration and time employed were statistically significant for the solubilization of macromolecular components at 95% confidence. After analysis of variance (ANOVA) for the coded model of the first order, it was verified that it was significant. In relation to the release of reducing sugars after the step of enzymatic hydrolysis, the highest concentration reached 5,20 g / L, the pretreatment time of 30 minutes and the concentration of 2,5% (m/v) H_3PO_4 , which refers to the more severe condition applied in the present study. In the range studied, the variables did not present statistical significance, but there was an indication of the influence of the acid concentration on the sugars released after the enzymatic hydrolysis. Lignin is a major drawback for dilute acid treatment, but the temperature and reaction time also interfere. It is necessary to re-evaluate the process conditions and to look for other hypotheses that can corroborate the viability of the production of 2G Ethanol.

Key words: Lignocellulose, diluted acid pretreatment, enzymatic hydrolyzate.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Matriz energética mundial (2015)	18
Figura 2 - Estrutura da celulose destacando as regiões cristalinas e amorfas.	22
Figura 3 - Representação esquemática da molécula de celulose	22
Figura 4 - Representação esquemática da hemicelulose	23
Figura 5 - Monômeros precursores da lignina.....	23
Figura 6 - Estruturas de materiais lignocelulósicos antes e após o pré-tratamento	25
Figura 7 - Mecanismo de hidrólise ácida das ligações glicosídicas	27
Figura 8 - Fluxograma representativo das etapas executadas na pesquisa.....	29
Figura 9 - Amostra da palha de cana-de-açúcar: “in natura” (a), moída (b) e amostra (c)	30
Figura 10 - Fações da palha da cana-de-açúcar no pré-tratamento: Durante o pré- tratamento (a); fração sólida (b); fração líquida(c).	32
Figura 11 - Etapa da produção da curva de calibração para determinação ARs: Antes do aquecimento (a); depois do aquecimento (b); amostra diluída (c)	34
Figura 12 - Curva de calibração para determinação da açúcares redutores	34
Figura 13 - Curva de calibração para determinação da atividade enzimática	36
Figura 14 - Superfície de resposta e curva de contorno para a solubilização de componentes macromoleculares	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição química de biomassas lignocelulosicas com potencial de produção para etanol de segunda geração	21
Tabela 2 - Níveis das variáveis independentes para o processo de pré-tratamento de palha de cana-de-açúcar com ácido fosfórico diluído.....	31
Tabela 3 - Matriz do planejamento fatorial 2 ²	31
Tabela 4 - Resultados obtidos após o pré-tratamento	38
Tabela 5 - Açúcares redutores liberados. após a etapa de hidrólise enzimática.....	39
Tabelas 6 - Componentes da Palha da cana “in natura”, pré-tratada e deslignificada....	40
Tabela 7 - Estimativa dos efeitos para os açúcares redutores liberados após a etapa de pré-tratamento	41
Tabela 8 - Estimativa dos efeitos para a solubilização de componentes macromoleculares (S _{cm}) na etapa de pré-tratamento.....	41
Tabela 9 - Coeficientes de regressão para a solubilização dos componentes macromoleculares após a etapa de pré-tratamento	42
Tabela 10 - Avaliação ANOVA para a solubilização de componentes macromoleculares.	42
Tabela 11 - Estimativa dos efeitos para os açúcares redutores liberados na etapa de hidrólise enzimática	44

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	OBJETIVO	17
1.1.1	Objetivo Geral	17
1.1.2	Objetivos Específicos	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
1.1	Matriz energética.....	18
2.1	Biocombustível	19
2.1.1	Etanol de Primeira Geração (E1G).....	19
2.1.2	Etanol de Segunda Geração (E2G).....	20
2.2	Biomassa Lignocelulósica	20
2.3	Composição da Biomassa Lignocelulósica	21
2.3.1	Celulose.....	21
2.3.2	Hemicelulose	23
2.3.3	Lignina	23
2.4	Etapas da produção do etanol 2G de palha de cana-de-açúcar	24
2.4.1	Pré-tratamento	24
2.4.2	Pré-tratamento ácido	25
2.4.3	Hidrólise.....	26
2.4.4	Hidrólise ácida.....	27
2.4.5	Hidrolise enzimática	28
2.4.6	Fermentação	28
3	MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1	Palha de Cana-de-açúcar	30
3.1.1	Preparo da Palha Cana-de-açúcar	30
3.2	Procedimento experimental para o pré-tratamento ácido	31

3.3	Hidrólise enzimática.....	33
3.3	Metodologia Analítica	33
3.3.1	Determinação de Açúcares Redutores	33
3.3.2	Cálculo de rendimento e solubilização	35
3.3.3	Determinação da atividade enzimática	35
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1	Análise do Planejamento experimental	38
4.1.1	Pré-tratamento	38
4.1.2	Hidrólise enzimática	39
4.2	Análises estatísticas do planejamento experimental	40
4.2.1	Açúcares redutores no hidrolisado ácido	41
4.2.2	Solubilização de componentes macromoleculares	41
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	45
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	46
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	47
	RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS E OTIMIZAÇÃO DE PROCESSOS. 2. Ed. Campinas, SP: Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2009.	49

1 INTRODUÇÃO

Desde as mais remotas eras a espécie humana tem se deparado com mudanças e vem adaptando-se a elas por uma questão de sobrevivência (ALBUQUERQUE, 2007). Maximizar o aproveitamento dos recursos disponíveis no meio ambiente, tais como, a flora (vegetais), a fauna (animais) e os minerais, foram fundamentais para que passássemos de nômades a sedentários e com o tempo formássemos tribos que viriam a originar as sociedades (ROOS, 2012).

Ao passo que evoluímos quanto Sociedade, firmamos uma relação de exploração com o meio ambiente tanto para atender as necessidades fisiológicas básicas, quanto para manter as atividades cotidianas (ROOS, 2012). Durante muito tempo essa relação se manteve equivalente, porém no século XVIII, com o início da industrialização, a balança que outrora equilibrada, agora pendia para o lado do consumo. Desse modo, estudos no campo energético passaram a ser desenvolvidos em busca de novas fontes ao redor do globo (SILVA, 2012).

A industrialização consumou a relevância do conhecimento sobre as fontes energéticas, pois, obtê-las significava potencializar o movimento econômico e consequentemente outorgando autonomia aos países que tiveram acesso privilegiado a tais recursos (GOLDEMBERG, 1998).

O primeiro grande pilar energético foi o carvão mineral, pois permitiu a Revolução Industrial, na Inglaterra, em meados do século XVIII, gerando cerca de 97% da energia consumida em todo mundo. Atualmente, o sistema energético internacional é baseado no consumo de combustíveis fósseis (carvão, petróleo e gás), sendo que cerca de 80% da demanda mundial se originam dessas fontes (OGEDA, 2010).

É fato que a matriz fóssil foi bastante benéfica ao desenvolvimento humano, no entanto, em longo prazo sua utilização mostrou-se nociva ao ambiental e capaz de abalar o equilíbrio econômico instaurado mundialmente (GODOI, 2009).

Os principais problemas são; a natureza finita desses recursos, e a queima dos combustíveis minerais; onde são produzidos os Gases Do Efeito Estufa (GEE).

Geralmente essa responsabilidade ambiental, é atribuída, majoritariamente, aos setores de produção de energia e dos transportes (MARTINE; ALVES, 2015).

Visando toda essa problemática ambiental, social e econômica, a partir de 1970 várias medidas engajadas à preservação dos ecossistemas e à autonomia energética passaram a ser discutidas em todo o mundo (SILVA, 2012).

Segundo Simoni (2006) as conclusões resultantes, via de regra, revelaram a necessidade de uma diversificação da matriz energética e que tenha como princípio a sustentabilidade. É neste cenário que os biocombustíveis surgem como uma proposta consistente, apresentando uma solução para a dependência da matriz fóssil.

No panorama brasileiro os dois principais biocombustíveis líquidos são o etanol, obtido da cana-de-açúcar, e o biodiesel, que é fabricado a partir de gorduras animais e de óleos vegetais (RIBEIRO; SCHIRMER, 2017).

O Brasil é detentor da mais avançada tecnologia para a produção e utilização do etanol. Tais avanços decorreram do Proálcool ou Programa Nacional do Álcool, criado em 14 de novembro de 1975 (CARVALHO, 2007). É ainda, um dos maiores produtores de biomassa ocupando um lugar de destaque, a nível mundial (ANDRADE, 2014).

No Plano Decenal de Expansão de Energia 2026 do Ministério de Minas e Energia (MEE), estima-se que a oferta interna de energia elétrica deve se expandir e a previsão é de que 50% dessa energia sejam provenientes de fontes renováveis não hídricas. Fontes como a biomassa da cana-de-açúcar (bagaço, palha) poderão atender uma parte considerável desta demanda crescente (ANDRADE, 2014).

O bagaço é fundamental para a cogeração e pode ser utilizado de formas variadas, já a palha da cana de açúcar (PCA), na maioria das vezes, é deixada nos campos pelas refinarias de açúcar e álcool, para a manutenção do solo (OLIVEIRA, 2012).

Todavia, compreendendo o amplo potencial da mesma, várias pesquisas foram realizadas, fundamentando que, o aproveitamento dessa palha residual pode proporcionar benefícios, econômicos e ambientais, maximizando a produção de etanol sem a necessidade de expansão da área plantada de cana-de-açúcar (OLIVEIRA, 2012)

O etanol de segunda geração é obtido através das etapas de pré-tratamento, hidrólise e fermentação (SÁ; BIANCHI, 2015). O pré-tratamento consiste em expor a celulose, hemicelulose e lignina presentes na fibra do vegetal e pode ser realizado de diversas maneiras (MOOD et al., 2013).

Dentre os métodos de desconstrução da parede lignocelulósica, nota-se que em termos de vantagens e desvantagens os métodos são equivalentes (SÁ; BIANCHI, 2015).

Analisando o cenário globalizado dos biocombustíveis, observando a disponibilidade de recursos no âmbito nacional e detectando uma etapa problemática do processo que impede o desenvolvimento do setor sucroenergético, justifica-se a necessidade, cada vez mais latente de que se desenvolvam pesquisas na área (STINGHELI, 2014).

No estudo em questão visa-se identificar o potencial energético da biomassa (palha) por meio da análise das etapas de pré-tratamento e hidrólise enzimática, posto que, atuam, como “gargalos” do processo, com intuito de fornecer dados qualitativos e quantitativos que indiquem a viabilidade da produção do etanol de segunda geração.

1.1 OBJETIVO

1.1.1 *Objetivo Geral*

O objetivo geral dessa pesquisa foi avaliar, em escala laboratorial, como a biomassa celulósica, proveniente da palha da cana-de-açúcar, se comporta nas etapas de pré-tratamento ácido e hidrólise enzimática, visando a produção de etanol 2G.

1.1.2 *Objetivos Específicos*

- Realizar as etapas de pré-tratamento da palha de cana-de-açúcar com o ácido fosfórico diluído a concentrações e tempos de reação diferentes, seguindo um planejamento fatorial 2^2 com repetições no ponto central;
- Determinar os rendimentos em base seca, solubilização de componentes macromoleculares, e a concentração de açúcares obtidos na etapa de pré-tratamento;
- Realizar a hidrólise enzimática da palha da cana de açúcar com o complexo de enzimas Celulase sob temperatura, pH e agitação controladas conforme as condições do planejamento experimental
- Determinar a concentração de açúcares no hidrolisado enzimático.

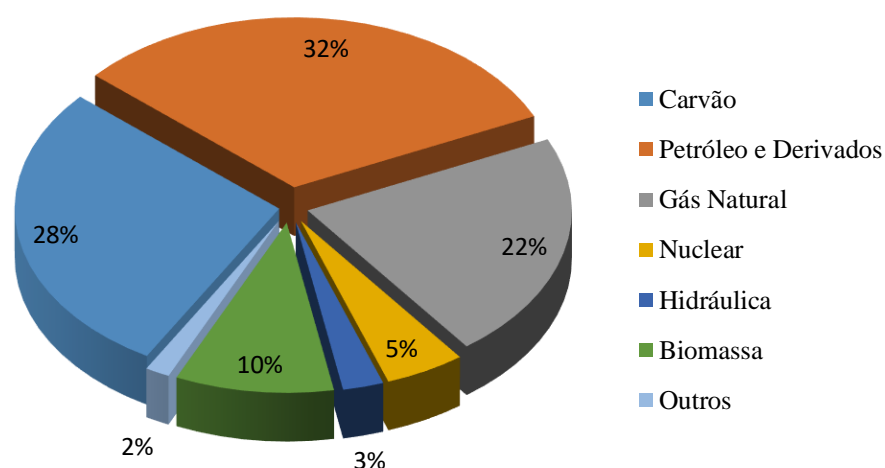
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Matriz energética

Define-se Matriz energética como toda forma de energia disponibilizada que pode ser transformada, distribuída e consumida por uma região (TOLMASQUIM; GUERREIRO; GORINI, 2007).

A matriz energética mundial diversificou-se nas últimas décadas, devido a diferentes condicionantes ambientais, sociais e econômicas. As principais fontes de energia utilizadas ao redor do globo estão destacadas na Figura 1.

Figura 1 – Matriz energética mundial (2015)



Fonte: Adaptado de Key world energy statistics. IEA, 2017

A matriz fóssil ainda é amplamente difundida, porém, Roos em 2013, afirmou que a dependências de fontes não renováveis gera condições econômicas instáveis.

Segundo *The Renewable Energy Policy Network for the 21st Century* (REN21), de 2016, a tendência é de que os investimentos em energias renováveis cresçam e se firmem cada vez mais como uma oportunidade garantida de negócios.

O cenário energético brasileiro se destaca mundialmente, visto que a sua matriz é repleta de recursos renováveis e o consumo de biocombustíveis é altamente difundido (ANDRADE, 2014).

Dentre tais, a cana-de-açúcar apresenta inigualável disponibilidade para os diversos fins energéticos, pois, além de ter características ideais a produção do etanol

combustível, também oferece a biomassa lignocelulósica da qual se pode obter o etanol de segunda geração (MANOCHIO, 2014).

2.1 Biocombustível

Conforme a ANP (Agencia Nacional de Petróleo e Gás Natural), biocombustível é toda aquela biomassa renovável que pode substituir, parcial ou totalmente, combustíveis derivados de petróleo e gás natural em motores à combustão ou em outro tipo de geração de energia.

O Brasil é reconhecido mundialmente por ser o maior produtor de etanol de primeira geração (E1G) derivado da cana-de-açúcar. Destaca-se também por ser um dos únicos países que integrou a produção de açúcar e etanol numa mesma planta, reduzindo os custos de processo (ANDRADE, 2014).

Na safra de 2017/2018 foram produzidos 635,6 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, resultando numa produção de 27 bilhões de litros de etanol (CONAB, 2018). Utilizando-se o bagaço e a palha como matéria-prima, e métodos de conversão apropriados, a produção de etanol poderá aumentar entre 50 e 100% por hectare de cana plantada (ANDRADE, 2014).

A transformação dos resíduos em bioetanol ou etanol de segunda geração consiste no processamento dos compostos presentes na biomassa (celulose, hemicelulose e lignina) em açúcares diretamente fermentescíveis, por meio das ações enzimáticas (OGEDA, 2010).

A metodologia do aproveitamento do bagaço e palha da cana-de-açúcar na produção do etanol permite que as usinas desenvolvam suas funções durante os períodos de entressafra em todo o país (CAMARGO, 2007).

2.1.1 Etanol de Primeira Geração (E1G)

A produção de etanol de cana-de-açúcar e sua utilização como combustível renovável é favorável em relação aos combustíveis fósseis para a sustentabilidade ambiental (STRAPASSON; JOB, 2006).

A tecnologia de produção do E1G está difundida ao redor do mundo, porém o Brasil domina o modelo de produção de etanol por via fermentativa, tornando o setor

sucroalcooleiro brasileiro, um dos mais competitivos ao redor do globo. No ano de 2018, estima-se uma produção de mais 28,16 bilhões de litros (CONAB, 2018).

A produção pode se dar a partir da sacarose da cana; ou pelo desenvolvimento científico e tecnológico de produção do etanol lignocelulósico, produzido a partir da celulose, hemicelulose e lignina (MANOCHIO, 2014).

2.1.2 Etanol de Segunda Geração (E2G)

As problemáticas que englobam o aquecimento global, a emissão dos GEE, a redução gradual das fontes de petróleo e a crescente demanda energética tem sido uma questão recorrente em conferências, reuniões e acordos em todo o mundo (SILVA, 2012).

Em abril de 2008, na XII Conferência das Nações Unidas sobre Comércio e Desenvolvimento (UNCTAD) foi firmada uma relação de cooperação técnica entre o Brasil e a África para que se estimulasse a produção de biocombustíveis (biodiesel, biogás e etanol de segunda geração) a partir de matérias-primas não utilizadas na alimentação – por exemplo: resíduos urbanos e de cultivos agrosilvopastoris.

O etanol de segunda geração (E2G) ou etanol celulósico (Ceetol), também chamado etanol de lignocelulose é a denominação dada ao álcool etílico obtido através da desconstrução das estruturas fibrosas dos vegetais, via reações químicas, físicas ou bioquímicas (HIJAZIN, 2010).

Entre os diferentes tipos de biomassas lignocelulósica, a palha de cana-de-açúcar se destaca como fonte energética. Apresenta grande potencial calorífico para a geração de eletricidade ou para a produção de etanol celulósico (FARINAS, 2011).

2.2 Biomassa Lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica é um dos recursos mais abundantes em todo o planeta. Porém, convertê-la em um insumo é uma tarefa complexa, pois suas características químicas e morfológicas conferem uma rigidez e pouca reatividade (SANTOS, 2012).

Esses materiais celulignosico são compostos, em média, por três frações orgânicas: celulose (35–50%), hemicelulose (20–35%) e lignina (10–25%), que formam um construto cristalino vegetal altamente estável que deve ser rompido para disponibilizar a fração sacarídea fermentescível. (VASCONCELOS, 2012).

A conversão da biomassa lignocelulósica em etanol envolve basicamente quatro etapas, o pré-tratamento; a hidrólise dos polissacarídeos realizada através das enzimas; fermentação dos açúcares e a recuperação do etanol por destilação.

2.3 Composição da Biomassa Lignocelulósica

Conforme afirmação de Ribeiro e Schirmer (2017) as estruturas que compõem a lignocelulose (celulose, hemicelulose e lignina) são constituídas, basicamente, de carbono, hidrogênio e oxigênio os quais formam polímeros naturais por associação de grupos funcionais, como ésteres e carboxilas. Dessa forma, apresentam estruturas altamente complexas e de composição variável.

As composições macromoleculares médias variam de acordo com o tipo de biomassa como pode ser visto na Tabela 1.

Tabela 1 – Composição química de biomassas lignocelulósica com potencial para produção de etanol de segunda geração

Biomassa Lignocelulósica	% Celulose	% Hemicelulose	% Lignina
Palha de cana	40-44	30-32	22-25
Bagaço de cana	32-48	19-24	23-32
Madeira dura	43-47	25-35	16-24
Madeira mole	40-44	25-29	25-31
Talo de milho	35	25	35
Espiga de milho	45	35	15
Algodão	95	2	0,3
Palha de trigo	30	50	15
Sisal	73,1	14,2	11
Palha de arroz	43,3	26,4	16,3
Forragem de milho	38-40	28	7-21
Fibra de coco	36-43	0,15-0,25	41-45
Fibra de bananeira	60-65	6-8	5-10
Palha de cevada	31-45	27-38	14-19

Fonte: Santos et al., 2012

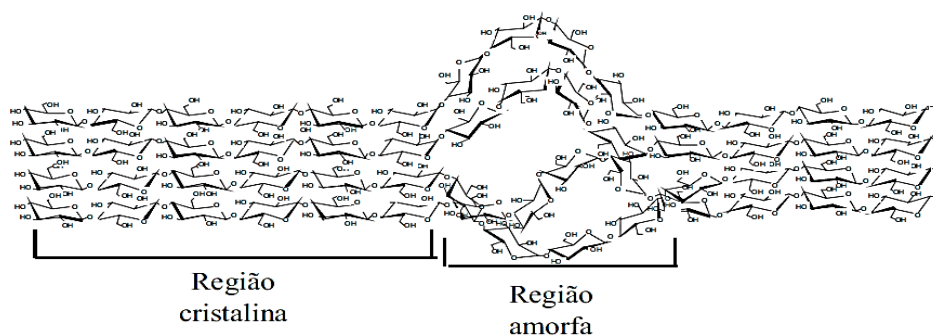
2.3.1 Celulose

A celulose é um polissacarídeo formado por monômeros de D-glicose, apresenta-se na forma de microfibras envolvidas por uma mistura de carboidratos complexos poliméricos.

Sua estrutura apresenta regiões cristalinas ordenadas, estabilizadas por ligações de hidrogênio intra e intermoleculares e regiões amorfas onde as cadeias apresentam uma orientação randômica (SANTOS, 2012).

Na Figura 2 é possível visualizar as regiões cristalinas e amorfas das estruturas celulósicas.

Figura 2 – Estrutura da celulose destacando as regiões cristalinas e amorfas.

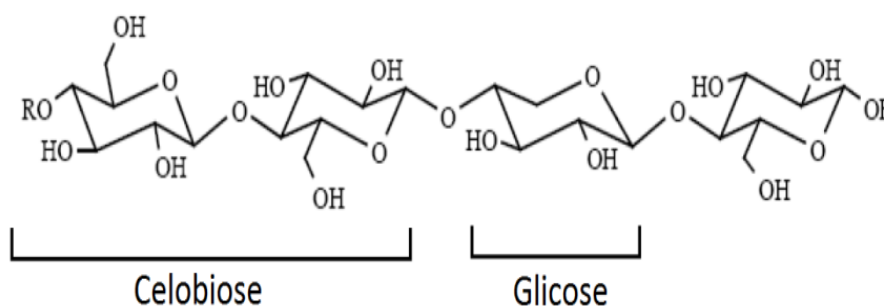


Fonte: Farinas, 2011.

A celulose, principal componente da parede celular da fibra, é um polissacarídeo linear, constituído por glicoses unidas através ligações α 1-4.

Sua fórmula molecular bruta é $(C_6H_{10}O_5)_n$, e pode assumir um valor de até 15.000 unidades de moléculas de glicose compondo a cadeia, porem quanto mais moléculas envolvidas, mais resistente se torna a estrutura vegetal (D'ALMEIDA, 1981). Representado na Figura 3.

Figura 3 - Representação esquemática da molécula de celulose

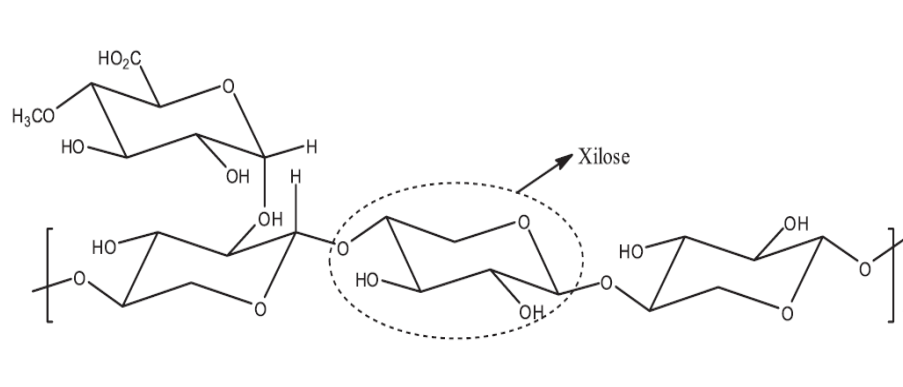


Fonte: Martinez, 2014

2.3.2 Hemicelulose

As hemiceluloses ou "meia celulose" são polissacarídeos constituídos de vários tipos de açúcares, além de serem ramificados e de cadeia mais curta que a celulose. Dentre esses açúcares, estão pentoses e hexoses (FARINAS, 2011). A Figura 4 exemplifica esse polissacarídeo.

Figura 4 – Representação esquemática da hemicelulose



Fonte: Santos, 2012.

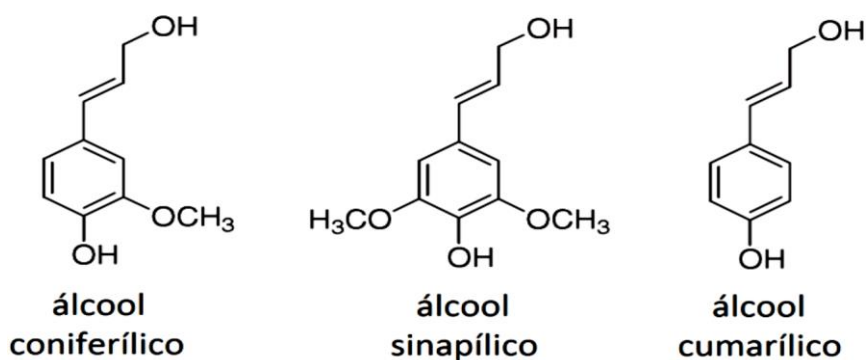
Esta macromolécula contém ácidos hexurônicos, como os ácidos β -D-glicurônico, D-4-O-metilglicurônico e β -D-galacturânico, e deoxi-hexoses.

A multiplicidade de ligações, de ramificações e a presença de diferentes unidades monoméricas contribuem para a complexidade da estrutura hemicelulósica e suas diferentes configurações (KOOTSTRA et al., 2009).

2.3.3 Lignina

A lignina é um polímero amorfo, de composição química complexa, que confere firmeza e rigidez ao conjunto de celulose. Apresenta natureza aromática predominante, é insolúvel em água e muito resistente à reação química, devido ao seu elevado peso molecular (ANDRADE, 2014). Alguns monômeros de lignina podem ser vistos na (Figura 5).

Figura 5 – Monômeros precursores da lignina.



Fonte: Martinez, 2014.

2.4 Etapas da produção do etanol 2G de palha de cana-de-açúcar

A palha da cana-de-açúcar possui três aplicações fundamentais: manutenção do solo, produção de etanol de segunda geração e produção de bioenergia (SANTOS 2012).

Os benefícios da manutenção do solo com a palha são diversos, pois essa biomassa constitui uma fonte de nutrientes e matéria orgânica, possibilitando, portanto, a diminuição do uso de fertilizantes, diminui também a ação de plantas daninhas, reduz erosão e mantém o solo úmido.

Contudo, com a eliminação gradativa da queima, a disponibilidade tende a aumentar (PAGEL, 2017).

Conforme Santos et. al. (2012) seu aproveitamento deve ocupar um lugar de destaque como matéria-prima para a produção de etanol combustível. Estima-se que uma tonelada de palha equivale a algo entre 1,2 a 2,8 EBP (equivalentes barris de petróleo).

O que pode determinar qual aplicação é mais vantajosa com relação às outras é a viabilidade de processo, no que diz respeito a, conjuntura econômica associada àquela atividade específica. Porém, a manutenção do solo tem sido uma escolha preferencial posto que as tecnologias de produção do E2G possuem etapas críticas de produção: o pré-tratamento e a hidrólise.

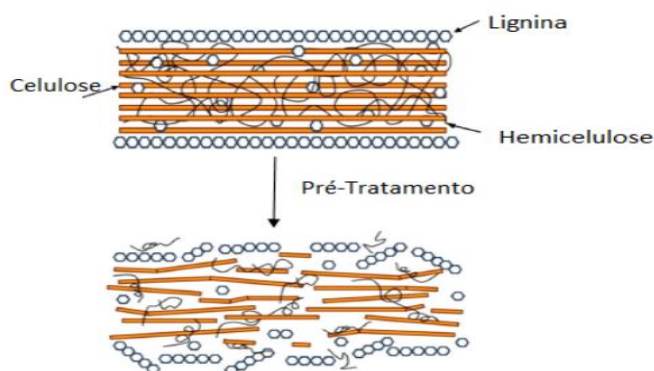
2.4.1 Pré-tratamento

A etapa de pré-tratamento ou pré hidrólise tem a finalidade de “desmontar” a parede vegetal e acessar os componentes diretamente conversíveis em etanol. Pode ser de caráter físico, físico-químico, químico ou biológico (SANTOS 2012).

Nos pré-tratamentos físico-químicos são utilizados agentes químicos ácidos, alcalinos ou água, em conjunto com processos físicos tais como: incremento de temperatura ou pressão, processos de descompressão rápida, utilização de ultrassom, entre outros.

Na Figura 6 está representado o efeito do pré-tratamento sobre a biomassa.

Figura 6- Estruturas de materiais lignocelulósicos antes e após o pré-tratamento



Fonte: MOOD et al., 2013.

O objetivo de um pré-tratamento é ser eficiente e econômico. Para tanto alguns pré-requisitos devem ser atendidos, como: aumentar a área superficial do material sólido e hidrolisar parcial ou totalmente a biomassa, produzir fibra celulósica reativa para o ataque enzimático; evitar a formação de possíveis inibidores de enzimas; minimizar os custos com a redução de tamanho da matéria-prima; reduzir os custos com material de construção dos reatores de pré-tratamento; produzir menos resíduos (VASCONCELOS, 2012).

2.4.2 *Pré-tratamento ácido*

Sabe-se que os ácidos são substâncias moleculares que, em solução aquosa, sofrem ionização, ocorrendo em compostos orgânicos ésteres, amidas, açúcares, dentre outros (HIJAZIN, 2010).

O pré tratamento ácido tem por objetivo degradar a hemicelulose, facilitando a sacarificação da celulose. Entende-se degradação como a clivagem da ligação β (1,4) - glicosídica, resultando em moléculas com grau inferior de polimerização, afetando as propriedades físico-químicas, como a viscosidade e a resistência mecânica. As pontes de

hidrogênio mantem a rigidez das regiões cristalinas da celulose tornando-a altamente resistente a degradações, não só pelo pré-tratamento ácido, como também alcalino e biológico (OGEDA, 2010)

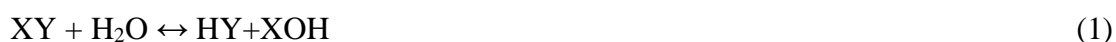
O tratamento ácido ocorre em solução aquosa, podendo ser diluída ou concentrada, porém quanto maior a concentração de reagente mais oneroso se torna o processo (HIJAZIN, 2010).

A hidrólise da celulose em ácido diluído necessariamente deve ocorrer sob condições de pressão e temperatura elevadas e tempos de exposição baixos, todavia, a conversão de celulose em glicose não ultrapassa 50%. Quando os processos envolvem tempos longos, temperaturas moderadas e concentração mais elevada (40-70%) a conversões de celulose de até 90% (VASQUES, 2007).

As condições utilizadas no pré-tratamento devem ser meticulosamente calculadas, posto que, a severidade das etapas pode resultar em compostos que são inibidores microbiológicos, inviabilizando o sequenciamento dos processos.

2.4.3 *Hidrólise*

A palavra hidrolise possui sua raiz etimológica no grego; hydrolysis (hidro: água; lysis: separação). Segundo Hijazin (2010) de modo geral hidrólise é uma reação química em meio aquoso onde a água sofre dupla decomposição e um hidrogênio da molécula é transferido para um dos produtos, e o grupo hidroxila (OH) é transferido outro produto, conforme mostrado a seguir na Equação 1:



Raramente a água, por si só, pode realizar uma hidrólise eficiente, fazendo-se necessário a inserção agente que possam viabilizar o processo. Os principais métodos utilizados são as hidrólises alcalina, ácida e enzimática (HIJAZIN; SIMÕES; SILVEIRA, 2010).

O produto da hidrólise é uma mistura de açúcares, cujo principal componente é a glicose. Ocorrendo êxito nessa etapa a biomassa, está pronta para ser fermentada e destilada assim como ocorre no processo de obtenção do etanol.

Atualmente com a utilização de enzimas na hidrólise, o tempo e a energia utilizada foram reduzidos, consequentemente, reduziram-se, parte dos custos envolvidos no processo.

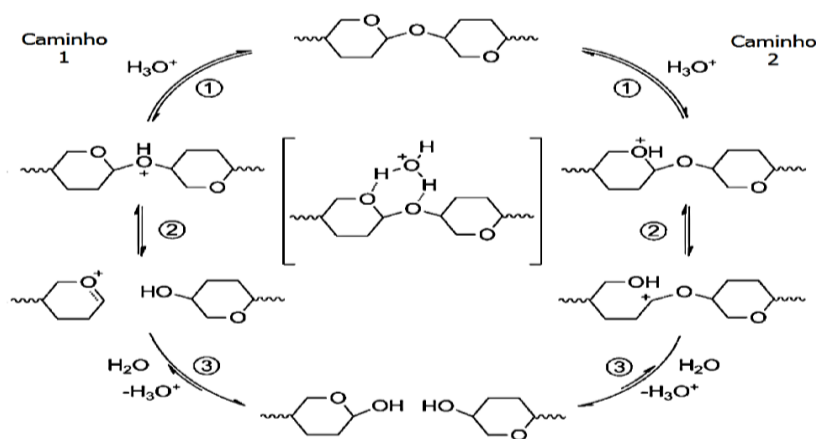
As enzimas são moléculas complementares aos complexos ativos das reações que eles catalisam. Logo, a configuração molecular que é intermediária entre reagentes.

Conforme dito por Linus Pauling, *Nature* (1948) “A atração da molécula da enzima pelo complexo ativado levaria assim a um decréscimo da energia de ativação da reação e a um aumento da velocidade de reação”.

2.4.4 Hidrólise ácida

Sabe-se que os ácidos são substâncias moleculares que, em solução aquosa, sofrem ionização, fornecendo como cátions íons H_3O^+ (hidroxônio). O mecanismo da hidrólise ácida (Figura 7) ocorre em três etapas, primeiramente o próton catalisa um dos oxigênios glicosídicos, seguido da quebra da ligação C-O formando um carbocation. Liberando um próton após a adição de água (LACERDA, 2012).

Figura 7 – Mecanismo de hidrólise ácida das ligações glicosídicas



Fonte: Lacerda, 2012.

A hidrólise ácida pode liberar até 90% dos açúcares retidos na biomassa, porém, a altas concentrações pode causar corrosão nos equipamentos. Uma alternativa para isso é a utilização do ácido diluído que libera 50% e facilita o processo de hidrólise enzimática (CESARIO, 2014).

2.4.5 Hidrolise enzimática

Os processos hidrolíticos são de extrema importância devido às complexas interações intra e intermoleculares que compõem a estrutura lignocelulósica; fatores como a natureza cristalina da celulose e a barreira física formada por ligninas ao redor das fibras, tornam indispensável o pré-tratamento para fragilizar a estrutura e reduzir a cristalinidade da celulose facilitando a ação das enzimas celulolíticas para a obtenção de glicose e outros açúcares diretamente fermentescíveis (OGEDA, 2010).

No processo enzimático de hidrólise da celulose a catálise é realizada por enzimas celulolíticas ou celulasas (CESARIO, 2014).

As celulasas são uma mistura de variadas enzimas, os principais grupos são a endoglicanase, que ataca regiões de baixa rigidez ou cristalinidade, a exoglicanase ou celobiohidrolase que e liga as extremidades da cadeia gerando glicose e celobiose e a β -glicosidase que quebra a celobiose em moléculas de glicose (VASCONCELOS, 2012).

As enzimas do complexo celulásico apresentam um efeito sinérgico, ou seja, o rendimento apresentado ao atuar conjuntamente é maior à soma dos rendimentos ao atuar isoladamente (VÁSQUEZ, 2007).

2.4.6 Fermentação

A fermentação alcoólica é o processo de conversão de açúcar em etanol e CO₂ por leveduras, em condições de anaerobiose. Ocorre em biorreatores que, no caso, são recipientes cilíndricos denominados dornas, onde são controladas a acidez e a temperatura para maximizar a ação das leveduras e aumentar a conversão em etanol. Os rendimentos fermentativos estão intimamente ligados ao controle de processo e também as etapas anteriores de obtenção da sacarose. Na produção do E2G o pré-tratamento e a hidrólise são fatores determinantes para a obtenção de bons rendimentos (PRATTO, 2015).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

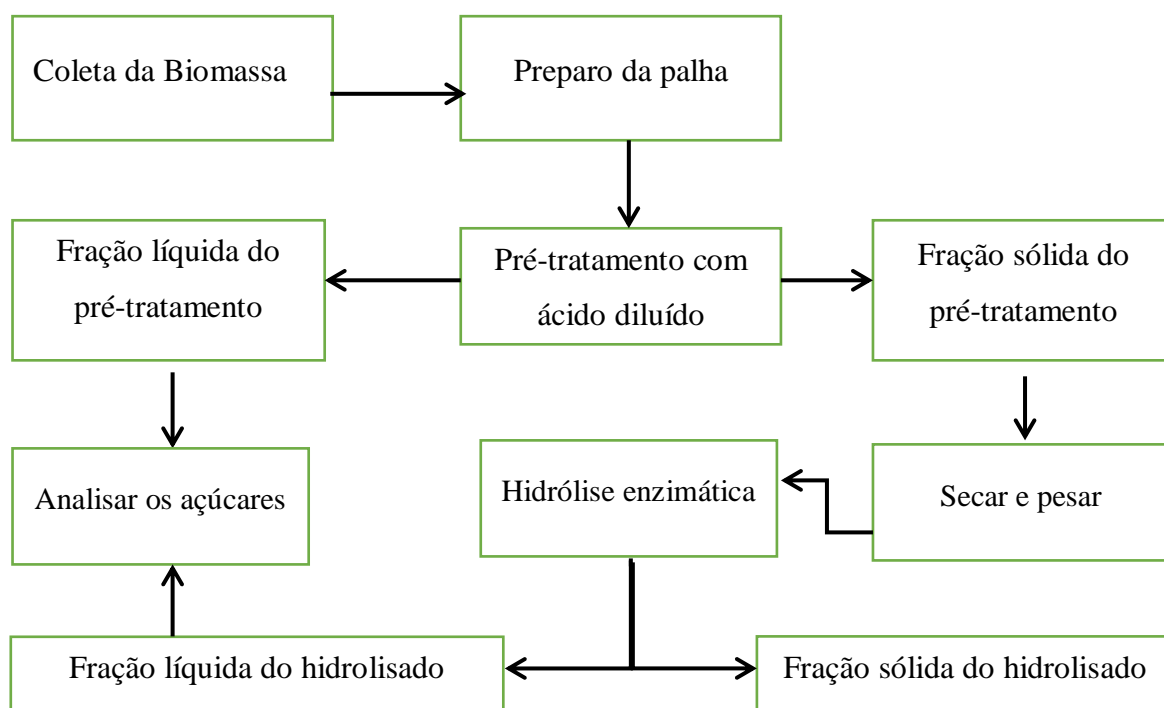
Este estudo foi realizado nos Laboratórios de Tecnologia Sucroalcooleira, Operações Unitárias e Processos e, de Físico-química, localizados no Centro de Tecnologia e Desenvolvimento Regional – CTDR, da Universidade Federal da Paraíba – UFPB, extensão do campus I.

Inicialmente foi realizada a etapa de preparo do material lignocelulósico, desde o processo inicial de lavagem, secagem, passando pelo pré-tratamento e finalizando com a hidrólise enzimática das amostras.

Ao passo que se realizaram os procedimentos, foram sendo efetuadas as devidas análises de rendimentos das frações sólidas e de açúcares redutores (ARs) - através do método DNS (Ácido 3,5 – Dinitrosalicílico).

Nesse trabalho foram executadas as etapas apresentadas na Figura 8.

Figura 8 - Fluxograma representativo das etapas executadas na pesquisa.



Fonte: Autor, 2018

3.1 Palha de Cana-de-açúcar

A palha da cana-de-açúcar, foi fornecida pela Usina Japungu, localizada na zona rural da cidade de Santa Rita, Paraíba.

A palha foi triturada na forrageira ainda na Usina, mas, antes de seguir para as etapas analíticas, foi submetida a etapa de preparo.

3.1.1 *Preparo da Palha Cana-de-açúcar*

O preparo foi feito com o objetivo de eliminar as sujidades presentes na amostra e maximizar os efeitos das etapas subsequentes (pré-tratamento e hidrólise enzimática) realizou-se do seguinte modo:

A moagem, feita no moinho de facas (SL – 31, da SOLAB) com uma peneira de mesh 10 para uniformidade da matéria-prima. A peneiração mecânica ocorreu numa mesa vibratória utilizando-se uma peneira com o mesh de 20, reduzindo a granulometria e aumentando a superfície de contato das amostras. Na Figura 9 podemos ver as amostras da palha de cana-de-açúcar que foram utilizadas no trabalho

Figura 9 – Amostra da palha de cana-de-açúcar: “in natura” (a), moída (b) e amostra (c).



Fonte: Autor, 2018.

Posteriormente foram pesadas, em triplicata, 2 g de palha numa balança analítica se fez a secagem, numa estufa (SL-100, da SOLAB) submetidos a uma temperatura de 105 °C, durante 24 horas, para determinar o peso seco.

Feito isso foram separadas sete amostras, com 35 g de palha moída (em base seca, ou seja, corrigida pelo peso seco) em sacos de plástico (zip-locks). As amostras foram submetidas à etapa de pré-tratamento conforme o planejamento experimental adotado.

3.2 Procedimento experimental para o pré-tratamento ácido

A palha de cana-de-açúcar preparada conforme descrito no item 3.1.1, foi submetida à etapa de pré-tratamento, seguindo um planejamento experimental 2^2 com 3 (três) pontos centrais, totalizando 7 (sete) experimentos distintos, realizados em duplicata, sendo as variáveis independentes do pré-tratamento o tempo e a concentração de ácido fosfórico. Os níveis codificados das variáveis independentes e a matriz do planejamento com as possíveis combinações de níveis e repetições no ponto central estão apresentados nas tabelas 2 e 3, onde -1 representa a menor condição, 1 a maior e 0 o ponto central.

Tabela 2 – Níveis das variáveis independentes para o processo de pré-tratamento de palha de cana-de-açúcar com ácido fosfórico diluído.

Variáveis Independentes	Símbolo	Limites		
		-1	0	+1
Tempo (min)	X_1	10	20	30
Concentração de H_3PO_4 (% , m/v)	X_2	0,5	1,5	2,5

Fonte: Autor, 2018.

Tabela 3 - Matriz do planejamento fatorial 2^2 .

Experimento	Variáveis Codificadas		Variáveis Reais	
	Tempo (min)	$[H_3PO_4]^*$	Tempo (min)	$[H_3PO_4]^*$
01	-1	-1	10	0,5
02	+1	-1	30	0,5
03	-1	+1	10	2,5
04	+1	+1	30	2,5
05 (PC)	0	0	20	1,5
06 (PC)	0	0	20	1,5
07 (PC)	0	0	20	1,5

* %, m/v; PC: ponto central

Fonte: Autor, 2018.

As concentrações de H_3PO_4 (0,5, 1,5 e 2,5%) foram estabelecidas a partir do trabalho de Bezerra (2016). Foi realizado em Autoclave, durante os tempos de 10, 20 e 30 minutos, na proporção de 1:10 da palha da cana de açúcar e solução ácida diluída.

Foram pesadas 35 gramas de palha em base seca e em seguida, introduzidas em Erlenmeyers de 500 mL. Os pré-tratamentos foram realizados em autoclave a 121 °C, com variação de tempo e concentração de ácido, conforme condições apresentadas na Tabela 3. Foi mantida uma relação sólido: líquido de 1:10 ou 10% (m/v). A autoclave foi fechada e deu-se início ao aumento de temperatura.

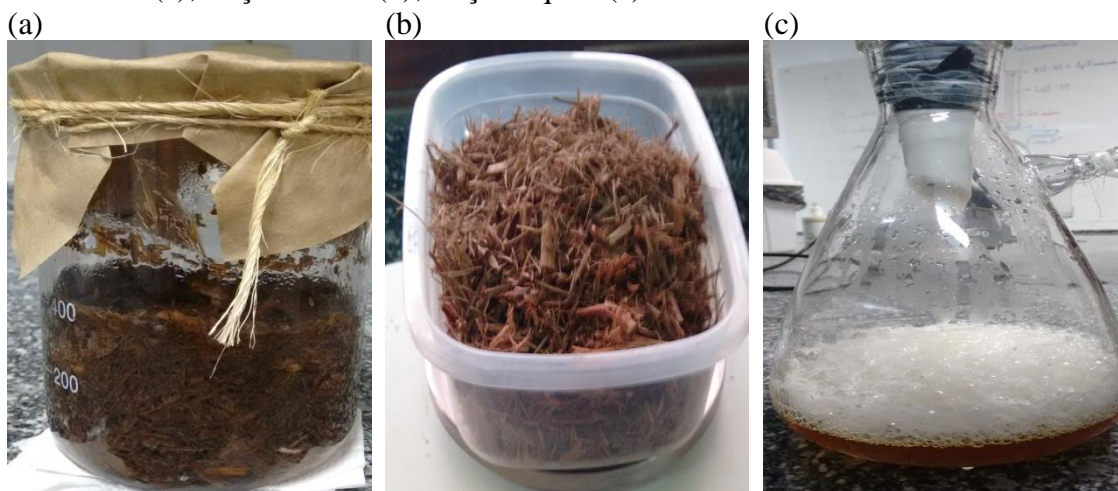
Quando a temperatura alcançou 121 °C, iniciou-se a contagem de tempo. Ao final da reação, esperou-se a redução da temperatura para a abertura da autoclave.

A palha pré-tratada foi filtrada em papel de filtro (C4; da UNIFIL) previamente seco a 60 °C por 24 horas. A fração sólida obtida foi lavada 3 vezes (1000 mL por lavagem) com água aquecida a 70 °C para remoção açúcares residuais.

As frações sólidas obtidas foram separadas para a etapa posterior de hidrólise enzimática. Para isto foram as amostras de palha foram secas em estufa a 60 °C, durante 24 horas. Após este tempo foram retiradas da estufa, colocadas em dessecador até o resfriamento e em seguida, pesadas para posterior determinação do rendimento, e consequentemente, da solubilização de componentes macromoleculares.

As frações líquidas foram submetidas à análise para quantificação de açúcares redutores. Na Figura 10 podemos ver as fações da palha da cana-de-açúcar na etapa de pré-tratamento.

Figura 10 - Fações da palha da cana-de-açúcar no pré-tratamento: Durante o pré-tratamento (a); fração sólida (b); fração líquida(c).



Fonte: Autor, 2018

3.3 Hidrólise enzimática

As hidrólises enzimáticas das amostras de palha pré-tratadas de acordo com o planejamento experimental (Tabela 3 – item 3.2), foram realizadas em duplicata, utilizando um Complexo Celulase (NS – 22086) cedido pela Novozymes Latin America Ltda.

Os experimentos de hidrólise foram realizados em frascos Erlenmeyer de 250 mL nas seguintes condições: volume reacional de 100 mL, concentração de palha de 2,0% (m/v), 50 °C, pH 4,8 (tampão citrato de sódio 50 mM), agitação de 150 rpm, em incubadora shaker (LUCA – 223, da LUCADEMA).

A carga enzimática utilizada foi de 15 FPU/g_{palha} e o tempo total de hidrólise de 72 horas. Ao final de 72 horas, as amostras foram submetidas a um banho em ebulição e banho de gelo, para inativação das enzimas. Em seguida, foram filtradas e submetidas à análise para determinação de açúcares redutores (VASCONCELOS, 2012)

3.3 Metodologia Analítica

3.3.1 Determinação de Açúcares Redutores

Para a determinação de açúcares redutores (ARs) presentes no hidrolisado ácido, ou seja, na fração líquida obtida após a etapa de pré-tratamento e, no hidrolisado enzimático foi empregado o método DNS (Ácido 3,5 – Dinitrosalicílico) descrito por Vasconcelos, Pinto e Aragão (2013).

Para isto, foi construída inicialmente uma curva de calibração, em duplicata, a partir de uma solução padrão de glicose, da qual foram realizadas diluições de forma a se obter concentrações de glicose num intervalo de 0,1 a 1,0 g/L. Adicionou-se 1 mL de cada diluição e 1 mL da solução de DNS em tubos de ensaio.

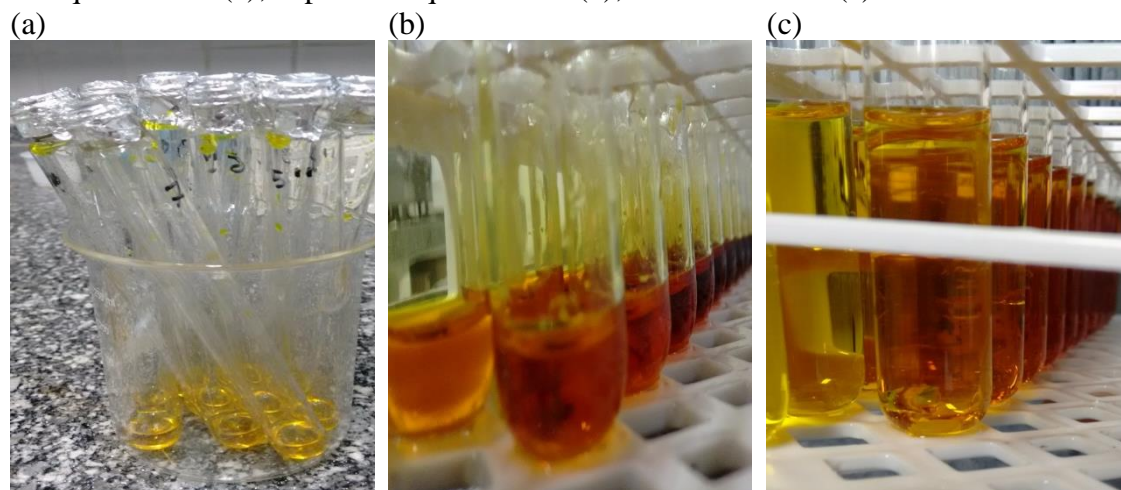
Em seguida levaram-se os tubos a aquecimento em banho termostático (Q218-9) a 100 °C, por 5 minutos. Ao final deste tempo, os tubos foram submetidos à resfriamento em banho de gelo, para interrupção da reação. Adicionaram-se à mistura reacional 8 mL de água destilada, completando um volume de 10 mL.

Na sequência as amostras foram homogeneizadas e realizou-se a leitura de absorvância, em espectrofotômetro (Edutec-FFQ-9005) a 540 nm.

Para as análises das amostras seguiu-se o mesmo procedimento empregado na construção da curva de calibração, sendo realizadas diluições quando necessário, de forma a se ter uma absorbância dentro do limite da curva construída.

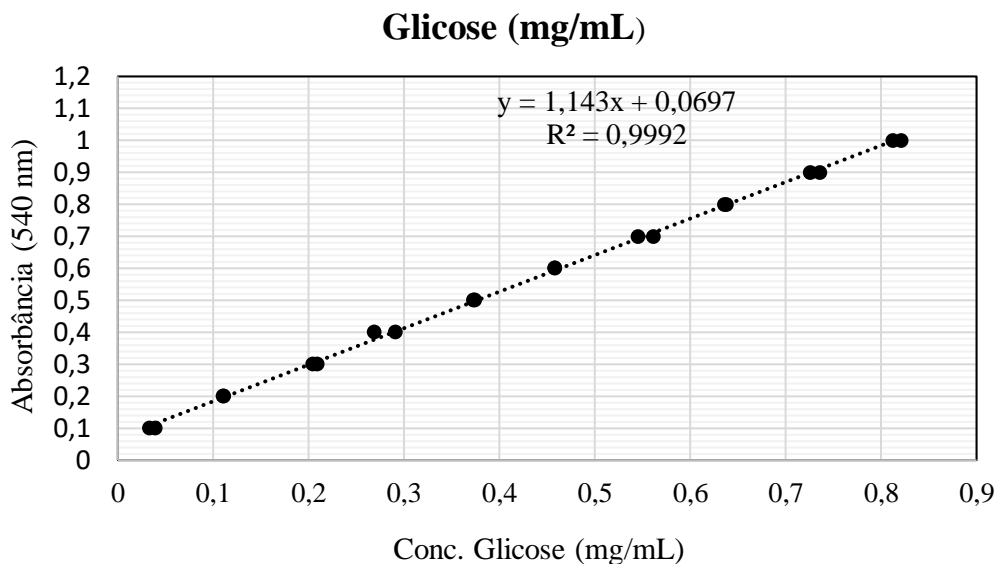
Nas Figuras 11 e 12 estão representados, respectivamente as etapas para a produção da curva de calibração e a curva de calibração pronta.

Figura 11 – Etapa da produção da curva de calibração para determinação ARs: Antes do aquecimento (a); depois do aquecimento (b); amostra diluída (c).



Fonte: Autor, 2018.

Figura 12 - Curva de calibração para determinação da açúcares redutores



Fonte: Autor, 2018.

3.3.2 Cálculo de rendimento e solubilização

Foram determinados, por gravimetria, os rendimentos das frações sólidas obtidas no pré-tratamento, em relação ao peso seco da palha inicialmente submetida ao pré-tratamento, conforme a Equação 2:

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{Massa final (base seca)}}{\text{Massa final (base seca)}} \times 100 \quad (2)$$

A solubilização dos componentes macromoleculares (S_{cm}), a partir da fração sólida de palha, foi utilizada a Equação 3.

$$S_{cm} = 100 - \text{Rendimento} \quad (3)$$

Sendo:

S_{cm} = solubilização dos componentes macromoleculares (% , m/m).

3.3.3 Determinação da atividade enzimática

De forma geral, a atividade enzimática é expressa em Unidades Internacionais (U). 1 U corresponde à quantidade de enzima capaz de formar 1 μmol de produto por minuto em condições ótimas de medida (pH, temperatura, etc.) especificadas para cada caso.

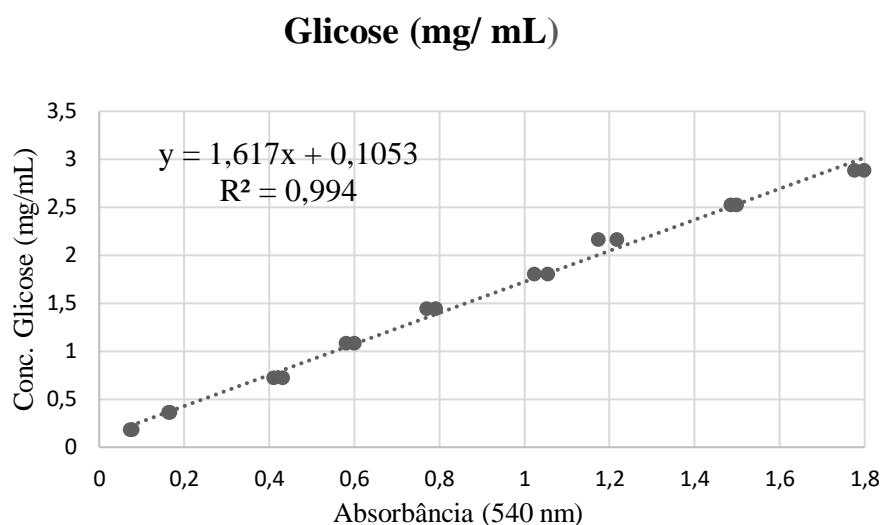
Quando o substrato é o papel de filtro, a Unidade Internacional é expressa em Unidade de Papel de Filtro (FPU).

Foi necessária a determinação da atividade FPU (Unidade de Papel de Filtro) para calcular a carga de enzimas necessárias à hidrólise enzimática da palha. No ensaio empregado para a determinação da atividade enzimática em FPU (Unidade de Papel de Filtro) utilizou-se a metodologia de Ghose (1987) adaptada.

A primeira etapa consistiu na preparação de uma curva de calibração (Figura 12), para quantificação de açúcares redutores, tomando por base a glicose.

Na Figura 13 está representada curva de calibração para determinação da atividade enzimática.

Figura 13 - Curva de calibração para determinação da atividade enzimática



Fonte: Autor, 2018.

Como substrato para a determinação da atividade enzimática foram utilizadas tiras de papel de filtro Whatman nº 1, medindo 1 cm x 6 cm (50 mg), tampão citrato de sódio 50 mM (pH 4,8) e reagente DNS (ácido 3,5-dinitro salicílico).

As tiras do papel de filtro, foram enroladas, em forma de espiral e colocadas em tubos de ensaio, aos quais se adicionou 1,0 mL de tampão citrato de sódio. Condicionaram-se os tubos ao banho termostático (Q218-9) a 50 °C, por 1 minuto.

Após 1 minuto, adicionou-se 0,5 mL da amostra de enzima, em cada tubo, agitando-se cuidadosamente.

Em paralelo, foi realizado o ensaio para controle da enzima o qual teve como objetivo a determinar a concentração inicial de açúcares redutores (ARs) presentes na amostra de enzima. Neste caso, apenas 1,0 mL de tampão citrato de sódio 50 mM e 0,5 mL da amostra foram adicionados em tubos de ensaio, sem a adição do substrato.

Um branco foi utilizado para zerar o espectrofotômetro, utilizando-se 0,5 mL de tampão citrato de sódio e 50 mM da enzima.

Todas as reações foram conduzidas a 50 °C, em banho termostático, 1 hora. Ao final deste tempo, as reações foram interrompidas pela retirada de 0,5 mL da mistura contida em cada um dos tubos, que foi colocada imediatamente em outros tubos contendo 0,5 mL de DNS (ácido 3,5-dinitro salicílico).

Todos os tubos foram submetidos a um banho em água a 100 °C, durante 5 minutos, e, em seguida, resfriados até a temperatura ambiente.

As amostras foram diluídas com 6,5 mL de água destilada, procedendo-se, então, à leitura da absorbância em espectrofotômetro (EduTec-FFQ-9005), a 540 nm.

A determinação da concentração de glicose liberada em cada ensaio enzimático foi realizada através da utilização de uma curva padrão de glicose previamente preparada, utilizando a Equação 4.

$$\text{Atividade (U/mL)} = \frac{\text{Dil.} \times (\text{Abs}_{\text{am}} - \text{Abs}_{\text{branco}}) \times \text{Fator (mg/mL)} \times \text{Vol. total (mL)}}{\text{tempo (min)} \times 0,18 (\text{mg}/\mu\text{mol}) \times \text{Vol. amostra (mL)}} \quad (4)$$

Onde:

Dil = diluição da enzima (se necessário);

Ab_{am} = valor da absorbância da amostra (enzima);

Ab_{Sbranco} = valor da absorbância do branco;

Fator = fator obtido da curva de calibração.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise do Planejamento experimental

4.1.1 Pré-tratamento

Os açúcares redutores liberados após a etapa de pré-tratamento, no hidrolisado ácido, assim como o rendimento da fração sólida remanescente e, por diferença, a solubilização dos componentes macromoleculares (S_{cm}) da palha de cana-de-açúcar estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Resultados obtidos após o pré-tratamento

Ensaio	X ₁	X ₂	Açúcares Redutores (g/L)	Rendimento (%)	Solubilização (%)
01	-1(10)	-1(0,5)	2,34	83,05	16,95
02	+1(30)	-1(0,5)	2,49	80,94	19,06
03	-1(10)	+1(2,5)	6,14	80,06	19,94
04	+1(30)	+1(2,5)	8,23	76,20	23,80
05	0(20)	-1(1,5)	7,64	79,14	20,86
06	0(20)	-1(1,5)	7,62	78,89	21,11
07	0(20)	+1(1,5)	7,57	79,20	20,80

X₁: tempo, X₂: concentração de ácido fosfórico

É possível observar através dos resultados obtidos após o pré tratamento que a concentração de açúcares redutores liberados no hidrolisado ácido variaram de 2,34 a 8,23 g/L, sendo a maior concentração encontrada no ensaio 04 que corresponde aos níveis máximos aplicados ao pré-tratamento (30 min e 2,5% de H₃PO₄).

O principal objetivo do pré tratamento com ácido fosfórico diluído é degradar grande parte da hemicelulose e desestruturar parcela da lignina e da celulose de materiais lignocelulósicos (SILVA, 2009).

Em relação à solubilização dos componentes macromoleculares, o máximo alcançado foi de 23,80% coincidindo com o ensaio 04 onde ocorreu maior liberação de açúcares redutores.

4.1.2 Hidrólise enzimática

As amostras de palha de cana-de-açúcar pré-tratadas conforme as condições do planejamento experimental foram submetidas ao processo de hidrólise enzimática de acordo com as condições descritas no item 3.3. Todas as hidrólises foram realizadas em duplicata.

A eficiência da hidrólise foi quantificada em termos de açúcares redutores liberados (Tabela 5).

Tabela 5- Açúcares redutores liberados. após a etapa de hidrólise enzimática

Ensaio	X ₁	X ₂	Açúcares Redutores (g/L)
01	-1(10)	-1(0,5)	1,00 ± 0,02
02	+1(30)	-1(0,5)	1,11 ± 0,02
03	-1(10)	+1(2,5)	3,55 ± 0,01
04	+1(30)	+1(2,5)	5,20 ± 0,02
05	0(20)	-1(1,5)	4,41 ± 0,03
06	0(20)	-1(1,5)	4,33 ± 0,01
07	0(20)	+1(1,5)	4,20 ± 0,01

X₁: tempo, X₂: concentração de ácido fosfórico

Através da Tabela 5, observa-se que a concentração de açúcares redutores liberados após a etapa de hidrólise enzimática das amostras de palhas pré-tratadas, variaram de 1,00 a 5,20 g/L. Observa-se ainda, que o maior valor de concentração foi para a amostra pré-tratada nas condições do ensaio 04, coincidindo com o ensaio no qual ocorreu uma maior solubilização de componentes macromoleculares

Cesário (2014), utilizou o bagaço de cana-de-açúcar como objeto de estudo. Para tanto, realizou a etapa de pré-tratamento com H₂SO₄ (1%, m/v), relação sólido: líquido de 1:5, em diferentes tempos, temperaturas e granulometrias. Após esta etapa, as amostras pré-tratadas foram submetidas à hidrólise enzimática, onde verificou-se que para as amostras provenientes do pré-tratamento à 120 °C, durante 20 min (condições de tempo e temperatura próximas às condições dos pontos centrais do presente trabalho), foram obtidas entre 0,12 e 0,16 g glicose/g bagaço após 48 horas de hidrólise.

No presente trabalho, a quantidade de açúcares redutores (1,5% de H_3PO_4 ; 20 min e 121 °C) foi em média 0,22 g_{açúcar redutor}/g_{palha}, após 72 horas de hidrólise.

Observa-se que as concentrações de açúcares redutores liberados após a etapa de hidrólise enzimática foram inferiores aos obtidos no hidrolisado ácido (após o pré-tratamento). Isto pode ter ocorrido devido à presença de lignina residual na fração sólida após o pré-tratamento, pois de acordo com Silva (2009), a lignina residual pode afetar negativamente a etapa subsequente de hidrólise enzimática.

Alguns materiais lignocelulósicos apresentam estruturas morfológicas rígidas e recalcitrantes necessitando de condições mais severas onde elevam-se as concentrações dos reagentes e utilizam-se temperaturas maiores que 150 °C (SILVA, 2009). Como pode ser visto na Tabela 6, o teor de lignina no pré-tratamento aumenta, o que significa que tal aumento pode ser devido à liberação de alguns açúcares.

Tabela 6 - Componentes da Palha da cana “in natura”, pré tratada e deslignificada (%)

Componentes da biomassa	Palha da cana “in natura” (%)	Palha da cana pré-tratada (%)	Palha da cana deslignificada (%)
Celulose	38,1±0,2	51,9±0,1	74,2±0,2
Hemicelulose	29,2±0,3	17,0±0,1	9,1±0,2
Lignina	24,2±0,2	29,0±0,1	14,9±0,2
Outros compostos	8,3±0,2	-	1,0±0,0
Total	99,8±0,1	99,8±0,3	99,2±0,6

Fonte: Adaptado de Silva, 2009.

4.2 Análises estatísticas do planejamento experimental

Através do emprego do planejamento experimental é possível avaliar a o comportamento das variáveis de suas interações no que diz respeito ao processo.

Buscou-se neste trabalho, dentro de condições pré-determinadas, encontrar os melhores resultados de pré-tratamento ácido diluído da palha de cana-de-açúcar, que levasse uma maior liberação de açúcares redutores, com o potencial necessário para uma possível obtenção de etanol de segunda geração. Foi determinada a solubilização das macromoléculas presentes na palha de cana e liberação de açúcares redutores obtidos a partir da hidrólise enzimática.

4.2.1 Açúcares redutores no hidrolisado ácido

Na Tabela 7 estão apresentadas as estimativas dos efeitos para os açúcares redutores liberados após a etapa de pré-tratamento, onde é possível se observar que não houve significância estatística, ao nível de 95% de confiança, para os intervalos de tempo e concentração de ácido estudados.

Tabela 7 – Estimativa dos efeitos para os açúcares redutores liberados após a etapa de pré-tratamento

	Efeito	Desvio Padrão	p	Limite de Confiança (- 95%)	Limite de Confiança (95%)	
	Média	6,00	0,80	0,004953	3,45	8,56
	X₁	1,12	2,12	0,634545	-5,64	7,88
	X₂	4,77	2,12	0,110410	-1,99	11,53
	X₁. X₂	0,97	2,12	0,678985	-5,79	7,73

X₁: tempo, X₂: concentração de ácido fosfórico; p: probabilidade de significância – p < 0,05

Fonte: Autor, 2018.

4.2.2 Solubilização de componentes macromoleculares

As estimativas dos efeitos para a solubilização de componentes macromoleculares estão apresentadas na Tabela 8.

Tabela 8 – Estimativa dos efeitos para a solubilização de componentes macromoleculares (S_{cm}) na etapa de pré-tratamento

	Efeito	Desvio padrão	p	Limite de Confiança (-95%)	Limite de Confiança (95%)
Média	20,36	0,29	0,000006	19,45	21,27
X ₁	2,99	0,76	0,029096	0,58	5,39
X ₂	3,87	0,76	0,014545	1,46	6,27
X ₁ . X ₂	0,88	0,76	0,331542	-1,53	3,28

X₁: tempo, X₂: concentração de ácido fosfórico; p: probabilidade de significância – p < 0,05 (estatisticamente significativo 95 % de confiança).

Fonte: Autor, 2018.

Verificados os efeitos significativos, com o objetivo de se obter o modelo codificado de primeira ordem para a solubilização dos componentes macromoleculares, realizou-se uma análise dos coeficientes de regressão (Tabela 9).

Tabela 9 – Coeficientes de regressão para a solubilização dos componentes macromoleculares após a etapa de pré-tratamento

	Coeficiente de regressão	Desvio Padrão	P	Limite de Confiança (- 95%)	Limite de Confiança (95%)
Média	20,36	0,29	0,000006	19,45	21,27
X ₁	1,49	0,38	0,029096	0,29	2,70
X ₂	1,93	0,38	0,014545	0,73	3,14
X ₁ .X ₂	0,44	0,38	0,331542	-0,77	1,64

X₁: tempo, X₂: concentração de ácido fosfórico; p: probabilidade de significância – p < 0,05 (estatisticamente significativo 95 % de confiança).

Fonte: Autor, 2018.

O modelo codificado que representa a solubilização de componentes macromoleculares após o pré-tratamento ácido é dado pela Equação 5.

$$S_{cm} (\%) = 20,36 + 1,49 X_1 + 1,93 X_2 + 0,44 X_1 X_2 \quad (5)$$

Os dados de análise de variância (ANOVA) para o modelo que representa a solubilização de componentes macromoleculares estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Avaliação ANOVA para a solubilização de componentes macromoleculares

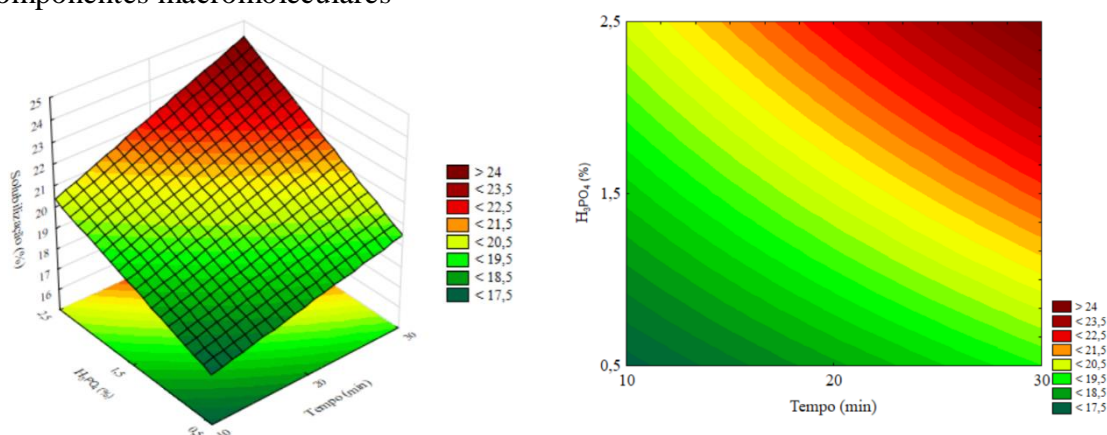
	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	F_{calc}	R² (%)
Regressão	24,61	3,00	8,20	14,31	93,47
Resíduo	1,72	3,00	0,57		
Falta de ajuste	1,67				
Erro puro	0,05				
Total	26,33				

F_{0,05;3;3} = 9,28 (Teste F = F_{calc}/F_{tab} = 1,54)

O coeficiente de determinação ou explicação (R^2) fornece uma medida da proporção de variação explicada pela equação de regressão em relação à variação total das respostas, sendo em geral, expresso em percentual, variando de 0 a 100% (RODRIGUES; IEMMA, 2009). Observa-se pela análise de variância que houve uma boa correlação do modelo com coeficiente de correlação de 93,47%. Além disso, o F calculado se apresentou superior ao F tabelado, sendo o modelo de primeira ordem para a solubilização de componentes macromoleculares significativo.

A Figura 14 ilustra o gráfico de superfície de resposta e curva de contorno referente à solubilização de componentes macromoleculares da palha de cana-de-açúcar, após a etapa de pré-tratamento, construídas com base no modelo apresentado na Equação 5.

Figura 14 - Superfície de resposta e curva de contorno para a solubilização de componentes macromoleculares



Fonte: Autor, 2018.

A solubilização tende a aumentar a medida que se elevam, a concentração do ácido fosfórico e o tempo de exposição. Através da superfície de resposta e curva de contorno, observa-se uma tendência de que, quanto mais severas forem as condições do processo, mais componentes serão solubilizados (Figura 14).

4.3.3 Açúcares redutores liberados após hidrólise enzimática

A estimativa dos efeitos para os açúcares redutores liberados após a etapa de hidrólise enzimática está apresentada na Tabela 11.

Tabela 11 – Estimativa dos efeitos para os açúcares redutores liberados na etapa de hidrólise enzimática

	Efeito	Desvio Padrão	p	Limite de Confiança (-95%)	Limite de Confiança (95%)
Média	3,40	0,46	0,005053	1,94	4,86
X ₁	0,88	1,21	0,520097	-2,97	4,73
X ₂	3,32	1,21	0,071290	-0,53	7,17
X ₁ . X ₂	0,77	1,21	0,570166	-3,08	4,62

X₁: tempo, X₂: concentração de ácido fosfórico; p: probabilidade de significância – $p < 0,05$

Fonte: Autor, 2018.

Para o intervalo de tempo e concentração de ácido fosfórico aplicados ao pré-tratamento da palha, os efeitos não apresentaram significância estatística sobre a liberação de açúcares após a etapa de hidrólise enzimática. Porém, conforme, os resultados obtidos há uma tendência de que o aumento da concentração de ácido possa contribuir significativamente.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No intervalo de tempo e concentração de ácido empregado, o pré-tratamento com não atingiu as expectativas quanto à degradação da estrutura lignocelulósica, principalmente da hemicelulose. Apresentou, de modo geral, uma baixa liberação de açúcares redutores. Apesar disso, foi demonstrada uma significância estatística quanto à solubilização, a nível de significância de 0,05 ($\alpha = 5\%$). O modelo para a solubilização destes componentes foi validado através da Análise de Variância (ANOVA), o qual apresentou um bom coeficiente de determinação (R^2) e por comparação entre os valores de F calculado e tabelado, apresentou-se significativo.

No que diz respeito à hidrólise enzimática os resultados também não apresentaram significância estatística. Porém, pode-se observar que a maior liberação de açúcares redutores ocorreu para as condições mais severas de pré-tratamento (30 minutos e 2,5% de H_3PO_4). Observou-se ainda, que há uma maior tendência sobre a influência do ácido sobre a liberação de açúcares redutores.

A hipótese desse trabalho foi a de que o ácido fosfórico diluído a diferentes concentrações e submetido a diferentes tempos de reação pode conferir viabilidade a produção do E2G, a qual foi testada mediante um planejamento experimental onde se objetivou degradar a biomassa e obter rendimentos que indiquem a viabilidade. A hipótese foi negada fazendo-se necessária a formulação de novas teorias que sejam de baixo custo e programáveis em escala industrial.

No Brasil há uma forte tendência de que a disponibilidade de palha aumente exponencialmente mediante a mecanização nos campos, essa abundância pode atender tanto a demanda das termoeletricas para a produção bioenergia quanto a crescente produção para o etanol.

A adoção de uma matriz energética mundial renovável vem se tornando um fato cada vez mais cotidiano, porém, a cultura do consumo da matriz fóssil é uma barreira que impede a ampliação do setor bioenergético. Faz-se necessário, desse modo, uma mudança comportamental que apare as arestas do individualismo latente em nossa sociedade e desenvolva uma consciência coletiva voltada à sustentabilidade.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para trabalhos futuros sugerem-se:

- Análise da influência da agitação nas etapas de pré-tratamento com ácido fosfórico diluído para a palha da cana de açúcar.
- Análise da influência da granulometria no pré-tratamento para a palha da cana-de-açúcar.
- Influência do preparo da palha para maximizar o pré-tratamento da palha da cana de açúcar.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS (ANP). **ANUÁRIO ESTATÍSTICO BRASILEIRO DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS**: 2017. Rio de Janeiro, 2017. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br>>. Acesso em: 15 out. 2018.

ALBUQUERQUE, B. P. **AS RELAÇÕES ENTRE O HOMEM E A NATUREZA E A CRISE SÓCIO-AMBIENTAL**. Rio de Janeiro, RJ. Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), 2007.

ANDRADE, L.F. **PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO** (Monografia apresentada ao programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais) Belo Horizonte, 2014.

BEZERRA, G. S. **AValiação da produção simultânea de xilitol e etanol a partir do bagaço de sisal** Dissertação (Mestrado) – UFPB/CCEN. João Pessoa, 2016.

CAMARGO, P.D. **FORÇA VERDE: UM NOVO CAMPO PARA A INDÚSTRIA QUÍMICA**. Revista Brasileira de Engenharia Química, p. 18-21, 2007

CARVALHO, S. P.; CARRIJO, E.L.de O. **PRODUÇÃO DE ÁLCOOL: DO PROÁLCOOL AO CONTEXTO ATUAL** XLV Congresso Da SOBER Universidade Federal De Goiás. Go. Brasil, julho de 2007.

CESÁRIO, A. L. L.; **INFLUÊNCIA DO TAMANHO DA PARTÍCULA NAS ETAPAS DE PRÉ-TRATAMENTO E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR** Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química. – Campinas, SP: [s.n.], 2014.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB) **ACOMPANHAMENTO DA SAFRA BRASILEIRA DA CANA-DE-AÇÚCAR** Primeiro levantamento v. 5 - Safra 2018/19, n. 1, Brasília, p. 1-62, maio 2018. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 3 out. 2018.

D'ALMEIDA, M.L.O. **CELULOSE E PAPEL. TECNOLOGIAS DE FABRICAÇÃO DA PASTA CELULÓSICA**. São Paulo. SENAI - IPT. Vol. I. 492p, 1981.

FARINAS, C. S. **A PAREDE CELULAR VEGETAL E AS ENZIMAS ENVOLVIDAS NA SUA DEGRADAÇÃO**. São Carlos: Embrapa Instrumentação, 2011. 13 p.

GODOI, J.M.A. **EFICIÊNCIA ENERGÉTICA INDUSTRIAL: UM MODELO DE GOVERNANÇA DE ENERGIA PARA A INDÚSTRIA SOB-REQUISITOS DE SUSTENTABILIDADE** - Dissertação (Mestrado-Programa Interunidades de Pós-graduação em Energia) - Universidade Federal de São Paulo. São Paulo, 2011.

GOLDEMBERG, J. **ENERGIA E DESENVOLVIMENTO**. Estud. Av. Vol.12 Nº.33 São Paulo Mai-ago. 1998.

HIJAZIN, C.A.H.; SIMÕES, A.T.; SLIVEIRA, D.R **HIDRÓLISE ÁCIDA, ALCALINA E ENZIMÁTICA** Revista Atitude - Faculdade Dom Bosco de Porto Alegre • Ano IV • Número 7 • Janeiro - Junho de 2010.

KOOTSTRA, A. M. J. et al. **OPTIMIZATION OF THE DILUTE MALEIC ACID PRETREATMENT OF WHEAT STRAW**. Biotechnology for Biofuels, v. 2, p. 1-14, 2009.

LACERDA, T.M.; **HIDRÓLISE DA POLPA DO SISAL COMO VIA DE PRODUÇÃO DE ETANOL E MATERIAIS**. Tese (Doutorado) Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, SP, 2012.

MANOCHIO, C. **PRODUÇÃO DE BIOETANOL DE CANA-DE-AÇUCAR, MILHO E BETERRABA: UMA COMPARAÇÃO DOS INDICADORES TECNOLÓGICOS, AMBIENTAIS E ECONÔMICOS**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química) – Universidade Federal de Alfenas– Campus de Poços de Caldas, MG, 2014.

MARTINE, G.; ALVES, J.E.D. **ECONOMIA, SOCIEDADE E MEIO AMBIENTE NO SÉCULO 21: TRIPÉ OU TRILEMA DA SUSTENTABILIDADE?** Rev. Bras. Estud. Popul vol.32, n.3, pp.433-460. E pub13 Nov, 2015.

MOOD, S. H et al. **LIGNOCELLULOSIC BIOMASS TO ETHANOL, A COMPREHENSIVE REVIEW WITH A FOCUS ON PRETREATMENT**. Renew Sustain Energy Rev, n. 27, p. :77–93, 2013.

OGEDA, T.L.; PETRI, D.F.S. **HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSA**. Quím. Nova Vol.33 Nº.7 São Paulo 2010.

OLIVEIRA, L.R.M. **ESTUDO DE ALTERNATIVAS DE PRÉ-TRATAMENTO E HIDRÓLISE DO BAGAÇO E PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA OBTENÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE CELULOSE** - Tese De Doutorado (Apresentada Na Escola De Engenharia De Lorena) – Lorena. S P, 2012

PAGEL, U.R. **ANALISE DA PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS A PARTIR DE RESÍDUOS AGROPECUÁRIOS**. Dissertação (mestrado em Engenharia e Desenvolvimento Sustentável) – Universidade Federal do Espírito Santo. ES, Brasil 2017.

PRATO, B. **HIDROLISE ENZIMÁTICA DA PALHA DA CANA-DE-AÇUCAR: ESTUDO CINÉTICO E MADELAGEM MATEMÁTICA SEMI- MECANÍSTICA** Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, 2015.

RIBEIRO, C.B.; SCHIRMER, W.N. **PANORAMA DOS COMBUSTÍVEIS E BIOCOMBUSTÍVEIS NO BRASIL E AS EMISSÕES GASOSAS DECORRENTES DO USO DA GASOLINA/ETANOL** Biofix Scientific Journal V. 2 Nº. 2 P. 16-22, 2017.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS E OTIMIZAÇÃO DE PROCESSOS**. 2. Ed. Campinas, SP: Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2009.

ROOS, A. **AGRICULTURA: DOS POVOS NOMADES AOS COMPLEXOS AGROINDUSTRIAIS** - Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, Rev. Elet. Em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental v(7), nº 7, p. 1423-1429, mar-ago, 2012.

SÁ, V.A.; BIANCHI, M.L. **MÉTODOS DE PRÉ-TRATAMENTOS DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA PARA PRODUÇÃO DE BIOETANOL** II Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia da Madeira Belo Horizonte - Set 2015.

SANTOS, F.A.; QUEIRÓZ, J.H.; COLODETTE, J.L.; FERNANDES, S.A.; GUIMARÃES, V.M.; REZENDE, S.T. **POTENCIAL DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA PRODUÇÃO DE ETANOL** Universidade Federal de Viçosa, Av. Peter Henry Rolfs, s/n, 36570-000 Viçosa – MG, Brasil, 2012.

SILVA, A.W.L.; SELIG, P.M.II; MORALES, A.B.T. **INDICADORES DE SUSTENTABILIDADE EM PROCESSOS DE AVALIAÇÃO AMBIENTAL ESTRATÉGICA**. Ambient. Soc. vol.15 no.3 São Paulo Set.-Dec. 2012.

SILVA, V.F.N. **ESTUDOS DE PRÉTRATAMENTO E SACARIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS COMO ETAPAS NO PROCESSO DE PRODUÇÃO DO ETANOL CELULÓSICO** Dissertação (Mestre Em Ciências – Pós Graduação Em Biotecnologia Industrial Na Área De Conversão De Biomassa) Lorena, SP, 2009.

SIMONI, C.A. **O USO DE ENERGIA RENOVÁVEL SUSTENTÁVEL NA MATRIZ ENERGÉTICA BRASILEIRA: OBSTÁCULOS PARA O PLANEJAMENTO E AMPLIAÇÃO DE POLÍTICAS SUSTENTÁVEIS**. Tese apresentada junto ao Programa de Doutorado em Meio Ambiente e Desenvolvimento. Curitiba, 2006.

STINGHELI, L. R. **DEMANDAS TECNOLÓGICAS DO ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO** - Bacharel em Gestão do Agronegócio da Faculdade de Ciências Aplicadas da Universidade Estadual de Campinas - Limeira, SP, 2014.

STRAPASSON, A. B.; JOB, L. C. M. de A. **ETANOL, MEIO AMBIENTE E TECNOLOGIA: REFLEXÕES SOBRE A EXPERIÊNCIA BRASILEIRA** Revista de Política Agrícola, Brasília, DF, ano 15, n. 3, p. 51-63, jul./set. 2006.

TOLMASQUIM, M. T.; GUERREIRO, A.; GORINI, R. **MATRIZ ENERGÉTICA BRASILEIRA: UMA PROSPECTIVA**. Novos estud. – CEBRAP, n.79, 2007.

VASCONCELOS, S. M. **PRÉ-TRATAMENTO HIDROTÉRMICO E COM ÁCIDO FOSFÓRICO DILUÍDO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA APLICAÇÃO EM BIORREFINARIAS**. Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2012.

VASCONCELOS, N. M.; PINTO, G. A. S; ARAGÃO, F. A. S., **BOLETIM DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO 88. DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES PELO ÁCIDO 3,5-DINITROSALICÍLICO: HISTÓRICO DO DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO E ESTABELECIMENTO DE UM PROTOCOLO PARA O LABORATÓRIO DE BIOPROCESSOS** - 2013.

VÁSQUEZ, P.A. **DESENVOLVIMENTO DE PROCESSO DE HIDROLISE ENZIMÁTICA E FERMENTAÇÃO SIMULTÂNEAS PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DO BAGAÇO DA CANA DE AÇÚCAR** (Tese de Doutorado em Ciências) Universidade Federal do Rio de Janeiro UFRJ, Programa de Pós-graduação de tecnologia em processos químicos e bioquímicos - RJ, 2007.